

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Airi Pennert

**Kasvukeskkonna mõju *Lsamp* geeni alternatiivsete promootorite
aktiivsusele 129S6/SvEv ja C57BL/6 hiireliinides**

Bakalaureusetöö

Juhendajad PhD Mari-Anne Philips
PhD Kersti Lilleväli

Tartu 2013

SISUKORD

SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1. Geenide ja keskkonna interaktsioon käitumise kujunemisel	5
1.2. Näriliste neuraalne areng isolatsioonis	6
1.3. Näriliste neuraalne areng rikastatud keskkonnas.....	7
1.3.1 BDNF	10
1.4. IgLON valguperekond.....	11
1.4.1 Limbilise süsteemiga seotud membraanvalk.....	11
2. EKSPERIMENTAALOSA	14
2.1. Töö eesmärgid	14
2.2. Materjal ja metoodika.....	15
2.2.1 Katseloomad	15
2.2.2 Ajuosade ja organite prepareerimine.....	15
2.2.3 RNA eraldamine ja cDNA süntees	15
2.2.4 Reaalaja-PCR	16
2.2.5 Andmete statistiline analüüs	17
2.3. Töö tulemused	17
2.4. Arutelu	21
2.5. Järeldused	24
KOKKUVÕTE	25
Tänuavaldused	26
Summary.....	27
KIRJANDUSE LOETELU.....	29

KASUTATUD LÜHENDID

129Sv – 129S6/SvEv Tac hiireliin

5-HT6 retseptor – 5-hüdroksütrüptamiini ehk serotoniini retseptor

BDNF – ajus toodetav närvikasvufaktor, *brain-derived neurotrophic factor*

Bdnf – ajus toodetavat närvikasvufaktorit kodeeriv geen närilistes

C57 – C57BL/6Bl hiireliin

DISC1 – geen, mis kodeerib valku *disrupted in schizophrenia 1*

EGF – epidermaalne kasvufaktor, *epidermal growth factor*

FGF – fibroblasti kasvufaktor, *fibroblast growth factor*

GDNF – gliiarakus toodetav kasvufaktor, *glial-cell-derived neurotrophic factor*

GPI – glükosüülfosfatidüül inositool

IGF – insuliinilaadne kasvufaktor, *insulin-like growth factor*

IgLON – immunoglobuliinide superperekoda kuuluv valguperekond

IM – individuaalmajutus ehk üksikmajutus

LAMP - limbilise süsteemiga seotud membraanvalk, *limbic-system associated membrane protein*

Lsamp – limbilise süsteemiga seotud membraanvalku kodeeriv geen

LTP – pikaajaline potentseerimine, *long-term potentiation*

NGF – närvi kasvufaktor, *nerve growth factor*

OBCAM – opioide siduv raku adhesioonimolekul, *opioid-binding cell adhesion molecule*

PFC – eesfrontaalkoor, *prefrontal cortex*

RM – rikastatud majutus ehk *enrichment*

SM – standardmajutus

SISSEJUHATUS

Käesoleva töö eesmärk on uurida interaktsioone geenide ja keskkonna vahel. Sotsiaalsed ning keskkondlikud tingimused on sageli käitumise ning haiguste väljakujunemisel sama olulised kui geneetiline eelsoodumus. Inimese elu jooksul geneetiline materjal ei muutu, kuid kõiki genee ei kodeerita valkudeks ning nende avaldumine muutub ajas. Iga päev vahetub inimese kehas 1-2 % kogu molekulaarsest koostisest, mistõttu meie füsioloogiline seisund täna või homme võib mõjutada organismi molekulaarset iseloomu järgmisteks nädalateks või kuudeks. Sotsiaalsed ning keskkondlikud tingimused mõjutavad transkriptoomi aktiivsust kesknärvisüsteemi kontrolli all olevate neuraalsete ja endokriinsete protsesside kaudu (Slavich ja Cole, 2013).

Varem on näidatud, et *Lsamp* geen on seotud sünaptilise plastilisusega (Hashimoto *et al*, 2009) ning *Lsamp*-puudulikkusega hiired ei ole isolatsiooni või rikastatud keskkonna mõjutustele nii tundlikud kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslased (Innos *et al*, 2012). Käesolevas töös huvitas meid, kas neuraalse adhesioonimolekuli *Lsamp* (limbilise süsteemiga seotud membraanvalk) ekspressiooni aktiivsus muutub, kui hiired kasvavad üles kolmes erinevas kasvukeskkonnas. Paigutasime hiired elama kas rikastatud, standard- või individuaalmajutusse.

Kuna *Lsamp* geeni aktiivsus avaldub kahe alternatiivse promootori kaudu (Pimenta ja Levit, 2004), siis määrasime alternatiivsetelt promootoritelt (1a ja 1b) transkribeeritavate mRNAde taset eraldi. Juba tuntud markerina on töös kasutatud *Bdnf* (ajus toodetav närvikasvufaktor) geeni, mille taseme tõusu näriliste hippokampuses on rikastatud keskkonnas kasvamise mõjul juba varem korduvalt näidatud (van Praag *et al.*, 2000). Kuna iga indiviidi geneetiline taust määrab nii üksikute geenide avaldumist kui reaktsioone keskkonnale, mis omakorda mõjutab geeniekspressiooni, viisime katse läbi kahe erineva hiireliini võrdluses (129S6/SvEv ja C57BL/6).

Selles töös läbi viidud eksperimendid teostati Tartu Ülikooli füsioloogia instituudis. Erinevad ajupiirkonnad hiire ajast eraldati väljaõppinud eksperdi poolt, kuid isiklikult eraldasid ajukudedest RNA, sünteesisin cDNA ning viisin läbi geeniekspressiooni kvantitatiivse reaallaja PCR meetodil. Osalesin koos teiste projektiga seotud tudengitega ka PCR andmete kvantiteerimises, statistilises analüüsis ja andmete tõlgendamises.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Geenide ja keskkonna interaktsioon käitumise kujunemisel

Keskkond on fenotüübi kujunemisel sama oluline kui geneetiline taust. Keskkond võib geenide poolt määratud tunnuste väljakujunemist kas soodustada või pärssida. Geneetiliste ja mitte-geneetiliste tegurite mõju fenotüübile uuritakse, kasutades mudelorganisme (Oliver ja Davies, 2012).

Närvisüsteemi häirete uurimiseks on levinuim mudelorganism hiir ning kui on teada inimestel haigust tekitav mutatsioon, on võimalik sama mutatsioon viia hiiremudelisse. Samas on oluline olla teadlik, et hiirele ei saa omistada inimese haigust, vaid haiguse sümptomeid ning eriti keeruline on uurida haigusi, mille sümptomiteks on hallutsinatsioonid või kujundlikust keelest mitte arusaamine. Samuti raskendab närvisüsteemi haiguste uurimist fakt, et enamus häireid on seotud mitme geeni ja nende koosmõjudega (Baker, 2011).

Selleks, et mõista mehhanisme, mis mõjutavad aju arengu käigus homeostaasi ja leida potentsiaalseid riskifaktoreid, mis suurendavad vastuvõtlikkust närvisüsteemi häiretele, kasutatakse uurimise käigus erinevaid stressoreid. Organismi arenguetappides mõjuvad stressorid on näiteks pärast sündi sotsiaalsesse isolatsiooni paigutamine, emast võõrutamine, immuunsüsteemi mõjutamine enne ja pärast sündi ning sünnieelne krooniline stress (Gresack *et al.*, 2010). Näiteks mõjutades tiinuse ajal DISC1 geenimutatsiooniga hiirte immuunsüsteemi, on nende järglased autismi sümptomitega. Keskkonda mõjutamata on järglased skisofreenia sümptomitega. DISC1 geeni seostatakse inimesel skisofreeniaga (Abazyan *et al.*, 2010).

Viimased uuringud kasvukeskkonna mõjust geeniekspressioonile on keskendunud hipokampuses toimuvale neurogeneesile ja sellest tulenevale neuraaalsele plastilisusele. Täiskasvanu neurogenees (ehk uute närvirakkude tootmine) hipokampuses aitab pidevalt muutuv keskkonnas kohaneda (Freund *et al.*, 2013). Freund *et al.* (2013) paigutasid 40 C57BL/6N hiireliini isendit rikastatud elukeskkonda ning analüüsisid nende aktiivsust. Kõik hiired olid kiibitud ning atraktsioonidega varustatud puuri paigutati 20 antenni, mis määrasid hiirte asukoha. Kolme kuu jooksul asustasid sama genotüübiga hiired erinevaid alasid ühest ja samast puurist ning nende aju kaal varieerus grupisiseselt rohkem kui kontrollrühmas, kus elasid hiired tavatingimustes. Aju kaalu suurenemine viitab neurogeneesi

toimumisele, mis korreleerub individuaalsete erinevuste tekkimisega keerukas keskkonnas (Freund *et al.*, 2013).

Neurogenees vahendab närvisüsteemi plastilisust ja seotust vastavalt individuaalsetele vajadustele. Igasugune häire neurogeneesis võib põhjustada neuroloogilisi haiguseid. On märkimisväärne, et erinevalt enamuse imetajatest, toimub inimesel neurogenees ainult hipokampuses ja mitte haistesibulas (Bergmann ja Frisen, 2013).

1.2 Näriliste neuraalne areng isolatsioonis

Imetajate eraldamine vanematest ja sotsiaalne isolatsioon varajases eas mõjutab suuresti aju arengut ja organismi käitumist täiskasvanuna (Gresack *et al.*, 2010). Sarnased keskkonna mõjutused võivad kaasa aidata psühhiaatriliste haiguste, näiteks depressiooni või skisofreenia, väljakujunemisele geneetilise eelsoodumusega inimestel. Aju arenemise perioodil isolatsiooni paigutatud mudelorganismide uurimine võimaldab mõista geneetilisi ja molekulaarseid seoseid neurobioloogias ning psühhiaatriliste haiguste tekkepõhjuseid. Samuti aitab see kaasa uute terapeutiliste ainete avastamisele ja hindamisele (Fone ja Porkess, 2008).

Näriliste püsiv sotsiaalne isolatsioon pärast võõrutamist põhjustab pikaajalisi käitumislikke muutusi võrreldes pesakonnaga koos kasvavate närilistega. Sotsiaalses isolatsioonis kasvanud rottidel on raskusi keskkonnast tuleva informatsiooni töötlemisel (Einon ja Morgan, 1977). Nad on liigselt emotsionaalsed ja närvilised ning neil esineb isolatsioonist põhjustatud stressi sündroom (Holson *et al.*, 1991)

Üks esimesi nähtusi, mida isolatsioonis kasvanud rottide juures tähele pandi, oli uues keskkonnas motoorse hüperaktiivsuse esinemine ja lühem puhkeaeg. Mikrokiipide analüüsil on leitud, et apoptoosi ja rakudifferentsiooni reguleerivate geenide ebanormaalne ekspressioon aju mediaalses eesfrontaalkoores (PFC) korreleerub hüperaktiivsusega uues keskkonnas pärast 26-päevast isolatsiooni. Seega ebatavaline aktiivsus PFC-s võib olla seotud skisofreenia sümptomitega või depressiooniga kaasneva ärevusega. Isolatsioonis kasvanud rotid viivitavad suletud ruumist uude keskkonda liikumisel kauem, mis viitab nende suurenenud ärevusele (Fone ja Porkess, 2008).

Premeerimides isolatsioonis kasvanud rotte toiduga, suureneb nende motivatsioon rohkem kui tavatingimustes kasvanud rottidel. Näiteks nad omandavad suhkrulahusega premeerides kiiremini ülesandeid, mis ei too neile otsest kasu. Varajane kognitiivne analüüs näitab, et

isolatsioonis kasvanud rottidel esineb puudulik vältimisreaktsioon ja nõrk mälu. Nende aeglane reageerimine hirmuolukordadele viitab puudustele seoste õppimises ning samuti kulub neil uute objektide ära tundmiseks kauem aega (Fone ja Porkess, 2008). Isoleeritud rotid on võimelised jätma meelde tuttavat objekti, kuid unustavad selle kiiremini kui tavatingimustes kasvanud rotid. See näitab suuremat ajutist ununemist (King *et al.*, 2011).

Sotsiaalne isolatsioon võib erinevate ajukoore ja hipokampuse neurotransmitterite funktsionaalsete muutuste tõttu põhjustada neuraalse plastilisuse vähenemist. Glutamaadi vähenenud funktsioon võib põhjustada uute esemete äratundmise võime halvenemist, mida saab ravida 5-HT₆ (ehk serotoniini) retseptori antagonisti manustamisega. Arvatakse, et ravimid, mis toimivad 5-HT₆ retseptoritele võivad pakkuda uudseid võimalusi neuraalse arengu kognitiivsete sümptomite (k.a. skisofreenia sümptomite) ravimiseks (King *et al.*, 2011).

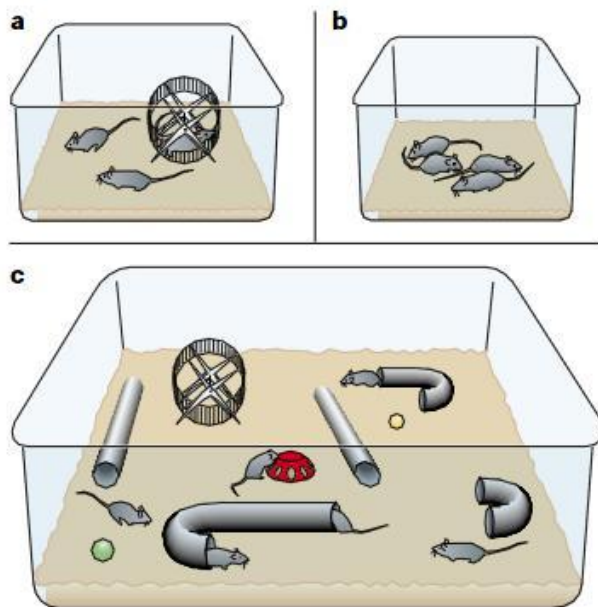
Isoleeritud näriliste aju frontaalsetes alades (eriti PFC-s ja hipokampuses) on märgatud puudusi normaalses arengus, struktuurses organisatsioonis ja dünaamilises kohanemises. Sellised muutused võivad seletada kognitiivseid puudusi. Isolatsioonis kasvanud hiirte puhul on märgitud hipokampuses ajus toodetava närvikasvufaktori (BDNF) ja selle mRNA taseme langust ja hammaskäärus alanenud neurogeneesi taset. Lülitades välja hiire hipokampuse hammaskääru neurogenees, kahjustub ruumiline ja esemete tuvastamise mälu (King *et al.*, 2011).

Uuringud seoses isolatsioonis kasvanud hiirte sotsiaalsete interaktsioonide, agressiooni, valu talumise ja ruumilise mäluga, on seni toonud vastuolulisi tulemusi. Tulemused erinevad suuresti olenedes roti liigitüvest, soost ja isolatsiooni algusest. Siiski on kindel, et ühest isolatsioonist tulenevast fenotüüpilisest tunnusest ei piisa antipsühhootilise potentsiaali ennustamiseks. Samuti pole ainult ühe loomudeli kasutamine turvaline mehhanism terapeutilise potentsiaali ennustamiseks keerukate neuropsühhiaatriliste haiguste puhul (Fone ja Porkess, 2008).

1.3. Näriliste neuraalne areng rikastatud keskkonnas

Rikastatud keskkond (ehk *enrichment*) erineb tavalistest laboritingimustest selle poolest, et katselooma sensorset, kognitiivset ja füüsilist aktiivsust üritatakse kunstlikult tõsta. Loomi hoitakse suuremates puurides, neid on ühes puuris rohkem koos ning puurid on mitmekesisema sisuga, neis leidub lisaks tavalisele allapanule ja pesamaterjalile ka tunneleid,

jooksurattaid, mänguasju ja muid atraktsioone. Taolisi lisaelemente ja ka toiduasukohti võidakse eksperimendi jooksul vahetada. Tähtis on sotsiaalsete interaktsioonide ja üldise aktiivsuse koosmõju, mitte ühe kindla elemendi olemasolu (van Praag *et al.*, 2000).



Joonis 1 Näide elamistingimustest erinevates eksperimentaalsetes gruppides. a - jooksurattaga puur (48 x 26 cm), b - standardne puur (30 x 18 cm), c - *enrichment* puur mänguasjade, tunnelite ja jooksurattaga 14 hiire jaoks (86 x 76 cm) (van Praag *et al.*, 2000).

Rikastatud elukeskkond mõjutab organismi nii aju arengu ajal kui ka täiskasvanuna. On leitud, et spontaanne füüsiline aktiivsus avaldab mõju neurogeneesile. Võrreldes tavatingimustes elavate hiirtega on rikastatud keskkonnas kasvanud hiirtel hammaskäärus rohkem uusi närvirakke ning need on pikemaalisemad. Samuti on neil rohkem gliarakke, paksem hipokampus ja dendriidid rohkem hargnenud (Kempermann *et al.*, 1997; van Praag *et al.*, 2000).

Kasvufaktorid omavad suurt rolli areneva organismi organsüsteemide väljakujunemisel, kuid mõjutavad ka neurogeneesi täiskasvanueas. Maksas toodetav insuliinilaadne kasvufaktor (IGF), mis on muuhulgas vajalik skeleti kasvuks, tõstab rottidel neurogeneesi taset. Epidermaalne kasvufaktor (EGF), mis osaleb epidermise arenemises ja kasvamises, neurogeneesi ei mõjuta. Fibroblasti kasvufaktor (FGF-2), mis on tuntud kui sidekoe stimuleerija ning embrüonaalne induktor mesodermi eristumiseks, ei ole samuti näidanud mõju neurogeneesile. On näidatud, et neurogeneesi regulatsioon sõltub BDNF valgu tasemest. Rikastatud elukeskkonnas kasvanud hiirtel on kõrgem närvi kasvufaktori (NGF), BDNF-i ja gliiarakus toodetava närvikasvufaktori (GDNF) geeni ekspressioon. Füüsiline aktiivsus tõstab

IGF-1, FGF-2 ja BDNF-i geeni ekspressiooni. Kasvufaktorid, eriti just NGF ja BDNF, osalevad ka õppimises ja sünaptilise plastilisuse väljakujunemises. NGF on vajalik sümpaatiliste ja sensoorsete neuronite eluks, vererakkude ja fibroblastide jagunemiseks ning närvisüsteemi neuronite diferentseerumiseks (Kärner, 1997; van Praag *et al.*, 2000).

Kognitiivset aktiivsust tõstetakse stiimulipõhiste ülesannetega, millega saab mälu treenida. On leitud, et taoline treening on terapeutilise toimega. Paljudes õppimise ja mäluga seotud geenides on näidatud ekspressioonimuutust võrreldes tava- ja rikastatud keskkonnas kasvanud katseobjekte (Pang ja Hannan, 2013). Rikastatud keskkonnas kasvanud hiired saavad paremini hakkama erinevate õppimisülesannetega nagu näiteks vesilabürint (*watermaze*) ja T-labürint (van Praag *et al.*, 2000).

Keskkonna rikastamise mõju haigustele uuritakse laialdaselt ning enamjaolt on mõju positiivne või ei ilmne erinevusi tavakeskkonnas kasvanud hiirtega. Rikastatud keskkonna mõju erinevate haiguslike tervises seisundite parandamisele on toodud välja tabelis 1.

Tabel 1 Rikastatud keskkonna terapeutiline mõju (van Praag *et al.*, 2000).

Seisund	Käitumislik tasand	Neuroanatomia	Molekulaarsel tasandil
ajukahjustus, trauma	parandab mälu ja motoorseid oskuseid	aju kaal suureneb, dendriitide hargnemine	andmed puuduvad
ajurabandus	motoorsed oskused paranevad	mõju puudub	NGF A ja glükokortikoidi retseptori mRNA tase suureneb. BDNF mRNA tase väheneb.
epilepsia	krambihoogude ennetamine	inhibeerib apoptoosi	kasvufaktorite geeniekspressioon suureneb
vananemine	parandab mälu	neurogenees suureneb, gliogenees väheneb	RNA koostise suureneb, NGF tase tõuseb
Huntingtoni tõve hiiremudel	ennetab krambihooge, parandab motoorseid oskuseid	peristriaalse peaaaju mahu suurenemine	haigus kujuneb välja hiljem
alkoholi manustamine enne sündi	mälu paraneb	mõju puudub	kortikaalne sünaptiline plastilisus paraneb
õppimis-puudega (<i>learning impaired</i>) 129/SvJ hiired	mälu paraneb	rakupooldumine ja neurogenees tõuseb	andmed puuduvad

Rikastatud keskkonna mõju uurimine on üpriski keerukas, sest tuleb arvestada väga paljude elustiku komponentidega. Arvesse tuleb võtta näiteks somatosensorseid, füüsilisi, sotsiaalseid ja kognitiivseid faktoreid. Tihti peale jagatakse rikastatud keskkonna mõjud

organismile füüsilisteks ja kognitiivseteks. Sellest tulenevalt tehakse laboratoorseid katseid uurimaks just kognitiivset *enrichment*i, ilma, et hiirtele pakutaks jooksurattaid ning füüsilist *enrichment*i uuritakse hiirtel, kelle mälu ei treenita. Tulemused erinevad suuresti. Näiteks on leitud, et kognitiivne *enrichment* ei paranda ruumilist mälu ega mõjuta BDNF-i ja neurogeneesi taset. Piirid kognitiivse ja füüsilise *enrichment*i vahel on hägusad. Kuna standardsetes laboritingimustes elavad hiired on võrreldes looduses elavate hiirtega stressiolukorras ning jooksurattal liikumine on neile uus tegevus, siis stimuleerib see ka looma kognitiivseid võimeid, mitte ainult füüsilisi. Parimad tulemused on saavutatud kognitiivset ja füüsilist rikastamist kombineerides (Bechara ja Kelly, 2013).

1.3.1 BDNF

Ajus toodetav närvikasvufaktor ehk BDNF kuulub neurotrofiinide valguperekonda. Neurotrofiinid on struktuurilt sarnased polüpeptiidised kasvufaktorid. Perekonda kuuluvad veel ka närvikasvufaktor (NGF), neurotrofiin-3 ja neurotrofiin-4. BDNF-i geen koosneb viiest eksonist, mis ekspresseeruvad enamjaolt ajus (kõige rohkem hipokampuses) ja ekson IV ekspressiooni on täheldatud kopsus ja südames (Metsis *et al.*, 1993).

BDNF geeni ekspressiooni mõjutavad erinevad füsioloogilised ja patoloogilised seisundid. Näiteks stimuleerib valgus BDNF-i ekspresiooni nägemiskoores, osmootiline stimulatsioon suurendab ekspresiooni hüpotaalamuses ja vurrude stimuleerimine suurendab ekspresiooni vurrukoos (barrel cortex). BDNF-i ja NGF-i ekspressiooni taset tõstab ka elektiline stimulatsioon, mis indutseerib hipokampuses pikaajalist potentseerimist (*long-term potentiation*, LTP). LTP on rakuline õppimise ja mälu tekkimise mudel. Samade geenide ekspressiooni hipokampuses tõstab ka füüsiline aktiivsus (Binder ja Scharfman, 2004).

BDNF mõjutab paljude närvirakkude ellujäävust ja soodustab nende kasvu. BDNF-i homosügootsetel *knockout* hiirtel puuduvad perifeersed sensoorsed närvirakud ja nad ei ela üle kolme nädala. Heterosügootsed BDNF-i *knockout* hiired on elujõulised, kuid neil esinevad erinevad fenotüüpilised muutused nagu näiteks ülekaalulisus, vähenenud tundlikkus krampidele (*decreased seizure susceptibility*) ja puudulik ruumiline õppimine (Binder ja Scharfman, 2004). Konditsionaalne BDNF-i geeni vaigistamine pärast hiire sündi põhjustab ülekaalulisust ja hüperaktiivsust (Rios *et al.*, 2001).

BDNF valku seostatakse paljude neuroloogiliste haigustega ning valu tunnetamisega. Näiteks uuritakse BDNF-i seost epilepsia, depressiooni, bipolaarse häire, Huntingtoni ja Alzheimeri tõvega (Binder ja Scharfman, 2004). On alust arvata, et füüsiline aktiivsus vähendab depressiooni ning tõstab BDNF-i mRNA ekspressiooni. Ka praegu kasutusel olevad

depressioonivastased ravimid tõstavad BDNF-i mRNA ja valgu taset, mistõttu uued farmakoloogilised strateegiad depressiooni ravimiseks keskenduvad BDNF-i potentsiaalsele depressioonivastasele toimele (Dias *et al.*, 2003).

1.4. IgLON valguperekond

Immunoglobuliinide superperekonda kuuluv IgLON valguperekond koosneb neljast valgust: LAMP (limbilise süsteemiga seotud membraanvalk), Neurotrimin(Ntm), OBCAM (opioide siduv raku adhesioonimolekul) ja Kilon. IgLON-id koosnevad kolmest immunoglobulini domeenist ja on ankurdatud plasmamembraanile GPI (glükosüülfosfatidüül inositol) ankruga. Membraanil paiknevad nad kolesteroolirikastel lipiidiparvedel, mis mõjutab nende signaalide saatmise võimet. LAMP, Neurotrimin ja OBCAM seostuvad perekonnasiseselt heterofiilselt. Nad toimivad enamjaolt heterodimeersete valkude subühikutena ning kaks IgLON-i moodustavad Digloni. Neljast valgust saab moodustada kuus erinevat funktsionaalset Digloni (Reed *et al.*, 2004)

IgLON perekonna valgud on raku adhesioonimolekulid, mis mõjutavad spetsiifiliselt neuronite arengut ning emotsioonidega seotud ajuosade ja nendevaheliste juhteteede kujunemist. Aju arengu jooksul osalevad nad aksonite pikenemises, sünapsi sihtmärkraku äratundmises, sünapsi suuruse ja tugevuse regulatsioonis ja sünapsite moodustumises (Washbourne *et al.*, 2004; Hashimoto *et al.*, 2009). Sünapsi molekulaarsed mehhanismid aksonite kasvukoonuse ja dendriitide vahel on olulised närvihaiguste, nagu näiteks autismi ja skisofreenia mõistmiseks (Washbourne *et al.*, 2004).

1.4.1 Limbilise süsteemiga seotud membraanvalk

LAMP valk ehk limbilise süsteemiga seotud membraanvalk on kodeeritud *Lsamp* geeni poolt, mis koosneb 2,2 megaaluspaarist (Mb), millel asub 11 eksonit. Geen on ebatavaliselt suur tänu pikkadele intronitele, mistõttu kaks eksonit (1a ja 1b) on üksteisest 1,6 Mb kaugusel. Suured intronid võivad sisaldada regulatoorseid elemente ja geenivaigistajaid. Intronite poolt ajutiselt reguleeritud transkriptsioon võib osutada väga tähtsaks organismi arenguetappidel ja patofüsioloogilistes protsessides. Inimese ja näriliste LAMP valgu aminohappeline järjestus on 99% sarnane, erinedes ainult 4 aminohappe poolest, mis näitab tugevat fülogeneetilist seost valgu struktuuri ja seostatud funktsionaalsete omadustega (Pimenta ja Levitt, 2004).

Uuringud närilistega näitavad, et *Lsamp* transkripti kõrgeenenud tase mitmetes ajuosades on seostatav ärevushäirete ning akuutse ja tingitud hirmuga (Innos *et al.*, 2012). Tingitud hirm on

kindla keskkonnateguriga seotud sündmuste kartmine (Maren, 2001). *Lsamp*-puudulikkusega hiired on väiksema kehakaaluga, aeglasemad ujujad, vähem ärevad ja vähem domineerivad ning uudsetes keskkondades aktiivsemad kui metsiktüüpi pesakonnakaaslased. Eemaldades genoomist *Lsamp* geeni eksoni 2, on hiirtel halvem ruumiline mälu ja õppimisvõime õppimisvõime (Qiu *et al.*, 2010). Kõrvaldades eksoni 1b, käituvad hiired vesilabürintis normaalselt ja puudub õppimise vaegus (Innos *et al.*, 2011). Tõsi, ei saa välistada ka võimalust, et mainitud erinevused kahe *Lsamp* geeni puudulikkusega hiire õppimise fenotüübis tulenevad hoopis nende taustast, sest Qiu *et al.* (2010) kasutasid C57 tausta viidud *Lsamp* geeni puudulikkusega hiiri ning Innos *et al.* (2011) kasutasid C57 ja SV segataustaga *Lsamp* geeni puudulikkusega hiiri.

Lsamp-puudulikkusega hiirtel on näidatud kõrgendatud vastust uutele keskkonnastressoritele, ka siis kui nende neuroanatomia ning sensoorne ja motoorne areng on normaalne (Hashimoto *et al.*, 2009). 2008. aastal uuriti Tartu Ülikooli füsioloogia instituudis 288 meessoost enesetapu ohvri ja 327 terve mehe DNAd ning leiti, et *Lsamp* geen võib omada rolli suitsiaalses käitumises (Must *et al.*, 2008). Behan *et al.* (2009) näitas, et LAMP valgu ekspressioon on skisofreenikute ja bipolaarse häirega inimeste *post mortem* otsmikukoos ligikaudselt 20% kõrgem. Inimese genoomi uuringutes seostatakse *Lsamp* geeni polümorfisme depressiooniga (Koido *et al.* 2012).

Enamikes senistes uuringutes on näidatud, et *Lsamp* geen ekspresseerub spetsiifiliselt limbilise süsteemiga seotud struktuurides ning on võimeline stimuleerima limbiliste neuronite kasvu. Rekombinantse *Lsamp* geeni transfekterimisel rakukultuurina kasvavatesse hipokampuse neuronite kultuuri on näidatud, et närviraku jätkete väljakasv intensiivistub. Samuti osaleb LAMP valk närvirakkude sihtmärgistatuse kujunemises (Pimenta *et al.*, 1995).

2004. aastal avaldasid Pimenta ja Levit hiire *Lsamp* geeni genoomse struktuuri ja näitasid, et *Lsamp* geenil on peale varem tuntud ekson 1, mida nüüd kutsutakse 1b, ka alternatiivne ekson 1a. Ekson 1a asub ekson1b-st 1,6 Mb ülesvoolu ja tal on oma promootorjärjestus. Nii 1a kui ka 1b promootori struktuurid on konserveerunud ja on kirjeldatud hiirel, rotil, inimesel ja kanal (Pimenta ja Levit, 2004; Brümmendorf *et al.* 1997).

TÜ füsioloogia instituudis on näidatud, et hiire aju on *Lsamp* geeni kahel promootoril väga erinev aktiivsus erinevates anatoomilistes piirkondades, lühidalt: 1a promootor ekspresseerub ajuosades, mida peetakse klassikaliselt limbilise süsteemi (Heimer ja Van Hoesen, 2006)

osadeks (hipokampus, amügdala ja temporaalsagar, insulaarkoor, tsingulaarkoor jt); 1b aga ekspresseerub valdavalt ajuosades, mis töötlevad sensoorset infot, näiteks nägemise, kuulmise ning puutetundlikkusega seotud tuumades ning koorealades (Philips *et al*, avaldamata andmed).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö üldisem eesmärk on uurida, kas kasvukeskkond mõjutab geenide ekspressiooni ning võrrelda tulemusi erinevate hiireliinide puhul erinevates ajuosades.

Töö alaeesmärgid on:

1. Uurida geeniekspressiooni muutusi kolmes erinevas kasvukeskkonnas (üksikmajutus, standardpuuris ja suures rikastatud tingimustega puuris).
2. Määrata kolmes erinevas keskkonnas kasvanud hiirte BDNF geeni ekspressioon kahes ajuosas (frontaalkoor ja hipokampus).
3. Määrata kolmes erinevas keskkonnas kasvanud hiirte Lsamp 1a ja 1b transkriptide ekspressioon kuues ajuosas (frontaalkoor, hipokampus, temporaalkoor, ventraalne striatum, hüpotaalamus, taalamus).
4. Viia uuring läbi kahe hiireliini (129S6/SvEv ja C57BL/6) võrdluses.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1 Katseloomad

Katseloomad paljundati ja genotüpiseeriti Tartu Ülikooli arstiteaduskonna füsioloogia instituudis. Katseloomadena kasutati 129S6/SvEv Tac (Taconic Europe, Bomholt, Taani) ja C57BL/6 Bkl (Scanbur AB, Sollentuna, Rootsi) hiireliine, mõlemast liinist võeti 24 isast isendit. Katseloomi hoiti puurides 12-tunnises valge/pime tsüklis. Valge tsükkel algas hommikul kell 7. Katseid viidi läbi kella 10.00 ja 17.00 vahel. Loomadel oli vaba ligipääs toidule ja veele, väljaarvatud katsete ajal.

Kolmenädalased hiired, kes olid emast võõrutatud, jagati juhuslikult kolme gruppi ning paigutati üksikmajutusse, standard- või rikastatud elukeskkonda. Enne katsete algust elasid nad mainitud tingimustes seitse nädalat.

Standardmajutus koosnes 425 mm x 266 mm x 155 mm suurusest puurist koos allapanu ja pesamaterjaliga. Üksikmajutus koosnes väiksemast puurist (220 mm x 160 mm x 140 mm) sama koguse allapanu ja väiksema koguse pesamaterjaliga. Rikastatud elukeskkonna puur oli 595 mm x 380 mm x 200 mm suur koos tavalise koguse allapanuga, kuid topeltkoguse pesamaterjaliga. Puuris olid roostevabast terasest jooksurattad, haavapuidust majad, iglud, torud või labürindid, mida kord nädalas vahetati või paigutati ümber. Igas rikastatud puuris oli alati viis eset, millest üks oli alati jooksuratas ja teine varjumisvõimalust pakkuv maja või iglu. Standard- ja rikastatud puurides elas 5-8 isendit, üksikmajutuses 1.

Hiirtega viidi läbi erinevaid käitumiskatseid (avarväli, fenotüüper (*PhenoTyper*®), kuuma plaadi katse, sotsiaalne interaktsioon, ujumine), millele eelnevalt süstiti neile olenevalt juhuslikult valitud grupist amfetamiini või füsioloogilist lahust. Kuna käitumiskatsed ei ole käesoleva töö teemaga seotud, siis neid antud töös ei puudutata.

2.2.2 Ajuosade ja organite prepeareerimine

Katseloomad hukati 10 päeva pärast käitumiskatsete lõppu tservikaalse dislokatsiooni läbi. Seejärel eemaldati pea keha küljest, järgnes aju eraldamine koljust. Eemaldatud aju prepeareeriti jääl, väljaõppinud eksperdi poolt eraldati frontaalkoor, hipokampus, hüpotaalamus, taalamus, temporaalsagar ja ventraalne striatum. Eraldatud ajustruktuurid külmutati koheselt vedelas lämmastikus ning säilitati temperatuuril -80°C.

2.2.3 RNA eraldamine ja cDNA süntees

Hiire ajurakkudest eraldati RNA homogeniseerimise teel. Selleks kasutati Trizol® reagenti (Invitrogen) ning tootja juhiseid. Proovid homogeniseeriti esialgu 50 µl Trizol reagensis.

Seejärel proovid uhmerdati ja lisati ülejäänud 450 µl Trizoli. Järgnevalt inkubeeriti proove toatemperatuuril 5 minutit ja lisati 100 µl kloroformi (Sigma-Aldrich) ning raputati tuube 15 sekundit. Neid inkubeeriti 2 minutit ja tsentrifuugiti eeljahutatud tsentrifuugis (Eppendorf 5810®) kiirusel 12 000 p/min 4 °C juures 15 minutit. RNA sisaldav vesifaas (u. 260 µl) tõsteti ümber uude eppendorffi ja lisati 250 µl isopropanooli (Naxo BioTop) RNA sadestamiseks. Proovid segati, inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril ja tsentrifuugiti kiirusel 12 000 p/min 4 °C juures 10 minutit. Järgnevalt isopropanool eemaldati ning RNA sadet pesti 1 ml 75% etanooliga. Proovid tsentrifuugiti viimast korda kiirusel 7500 p/min 4 °C juures 6 minutit.. Etanool eemaldati ning RNA sade suspendeeriti üles 50 µl vees. RNA kontsentratsioon mõõdeti NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetril (NanoDrop Technologies).

RNA-st sünteesiti cDNA kasutades SuperScript™ III pöördtranskriptaasi (Invitrogen) ning heksameeri (Applied Biosystems) praimerit vastavalt tootja juhendile. Olenevalt RNA kontsentratsioonist proovis võeti seda 10–22 µl ning lisati vastavas koguses vett, et saavutada kogus 22 µl. Sellele lisati 4 µl praimer-dNTP segu, mis koosnes 2 µl 10mM dNTP (Fermentas) ja 2 µl heksameetrist (50 µM). Praimerite seondumiseks inkubeeriti proove 5 min 65°C juures. Seejärel tõsteti tuubid reaktsiooni peatamiseks 1 minutiks jääle. cDNA sünteesiks lisati proovidele 8 µl 5X First-Strand Buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8,3 toatemperatuuril), 375 mM KCl, 15 mM MgCl], 2 µl 0.1 M DTT, 3 µl H₂O ja 1 µl SuperScript™ III pöördtranskriptaasi (200 U/µl). Proove suspendeeriti õrnalt ning inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril ning seejuures 50 °C juures 60 minutit. Reaktsioon peatati asetades proovid 15 minutiks 70 °C termostaati. Sünteesitud cDNA proovid säilitati -80 °C juures.

2.2.4 Reaalaja-PCR

BDNF-i geeni ja Lsampi 1a ja 1b promootorregioonide mRNA tase tehti kindlaks kvantitatiivse reaalaja PCR (qRT-PCR) meetodit kasutades ABI Prism 7900HT Real-Time PCR masinal (Applied Biosystems, USA). BDNF-i taset mõõdeti frontaalkoores ja hipokampuses, Lsampi promootorregioonide taset mõõdeti frontaalkoores, hipokampuses, hüpotaalamuses, taalamuses, temporaalsagaras ja ventraalses striatumis. TaqMan-i reaktsioon disainiti kasutades FAM-MGB sondi (AACCGAGGCACGGACAAC) koos universaalse reverse-praimeriga (TTCTTGTCTTCTACCACACACCTG) ja spetsiifiliste forward-praimeritega. 1a forward-primeri järjestus on GCATTTTGGAAACCAGCCTCCTG ja 1b CGATCGGAAACAGTTGCCGC. 24 cDNA proovi kohta valmistati 60 µl kolme erinevat praimer-sondi segu, mis koosnes 3 µl vastavast sondist, 10,8 µl forward- ja reverse-praimerist ning 35 µl destilleeritud veest. BDNF-i ekspressiooni mõõtmiseks kasutati BDNF

Taqman Gene Expression Assay-t (Applied Biosystems, Assay ID: Mm01334042 m1), mis sisaldas nii praimereid kui ka sondi. Iga 2 µl cDNA kohta lisati 17,5 µl vett, 21,7 µl TagMan puhvrit (TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA) ja 2,3 µl praimer-sondi segu. Reaktsioonisegule tehti *vortex* ja *spin-down* ning villiti 4 korduses 10 µl. Lsampi ja BDNF-i transkriptide ekspressiooni tase mõõdeti FAM- märgistatud MGB-sondi kasutades ja standardiseeriti koduhoidja geeni HPRT VIC-22 TAMRA sondi suhtes. HPRT forward-praimer on järjestusega GCAGTACAGCCCCAAAATGG ja reverse-praimer on järjestusega AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA.

ABI Prism 7900 SDS 2.4.2 tarkvara vahendusel saadi andmed, mis analüüsiti ja teisendati 2 – Δ CT kujule, kus Δ CT on sihtmärkgeeni ja koduhoidjageeni tsükli läbimise(CT) vahe.

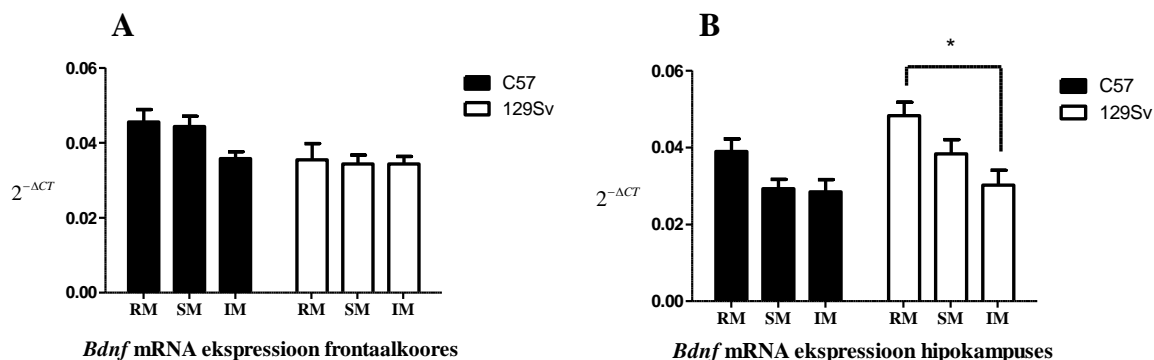
2.2.5 Andmete statistiline analüüs

Andmete analüüsimiseks kasutati programmi Statistica 8.0. Ekspressioonitasemete võrdlemiseks erineva genotüübi ja kasvukeskonna juures kasutati faktoriaalset ANOVA analüüsi. Jooniste tegemiseks kasutati GraphPad Prism 5.02 versiooni. Andmed esitatud keskmiste ekspressiooni väärtustena koos keskmise standardveaga (SEM).

2.3. Töö tulemused

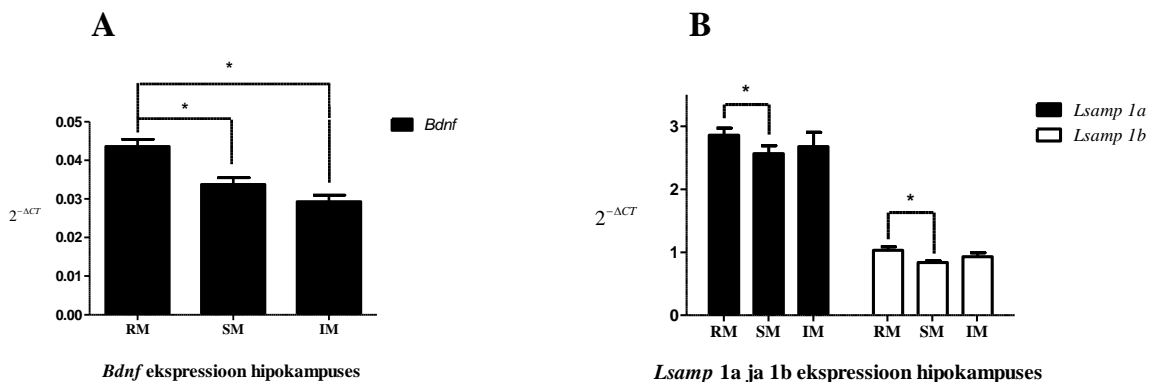
Frontaalkoores ekspresseerus *Bdnf* mRNA keskmiselt C57 hiireliinis rohkem, kui 129SV hiireliinis (joonis 2A; $F(1,42)=9,14$; $p<0,01$). Erinevad kasvukeskkonnad ei olnud *Bdnf* mRNA ekspressioonile statistiliselt olulised ($p>0,01$).

Hipokampuses oli 129Sv hiireliini puhul näha just keskkonnast tulenevat mõju *Bdnf* mRNA ekspressioonile. Rikastatud keskkonnas kasvanud hiirte *Bdnf* mRNA ekspressiooni tase oli oluliselt kõrgem kui individuaalmajutuses kasvanud hiirtel (joonis 2B; $F(2, 42)= 9,45$; $p<0,01$). C57 hiireliini puhul keskkond geeniekspressiooni ei mõjutanud. Erinevalt frontaalkoores, avaldus hipokampuses *Bdnf* rohkemal määral 129Sv hiireliinis kui C57 liinis ($F(1,42)=6,00$; $p<0,01$). Nii frontaalkoores kui ka hipokampuses *Bdnf* mRNA ekspressioon on illustreeritud joonisel 2. Joonisel 3A on näha *Bdnf* ekspressiooni hipokampuses summeeritud hiireliinide korral. Genotüüpide erinevusi arvestamata tuleb *Bdnf* ekspressioonitaseme erinevus erinevates keskkondades selgemini välja. *Bdnf* mRNA tase on rikastatud keskkonnas kasvanud hiirte hipokampuses kõrgem kui standard- või individuaalmajutuses kasvanud hiirte ajus.



Joonis 2 BDNF mRNA ekspressioon frontaalkoores ja hipokampuses. RM – rikastatud majutus, SM – standardmajutus, IM – individuaalmajutus.

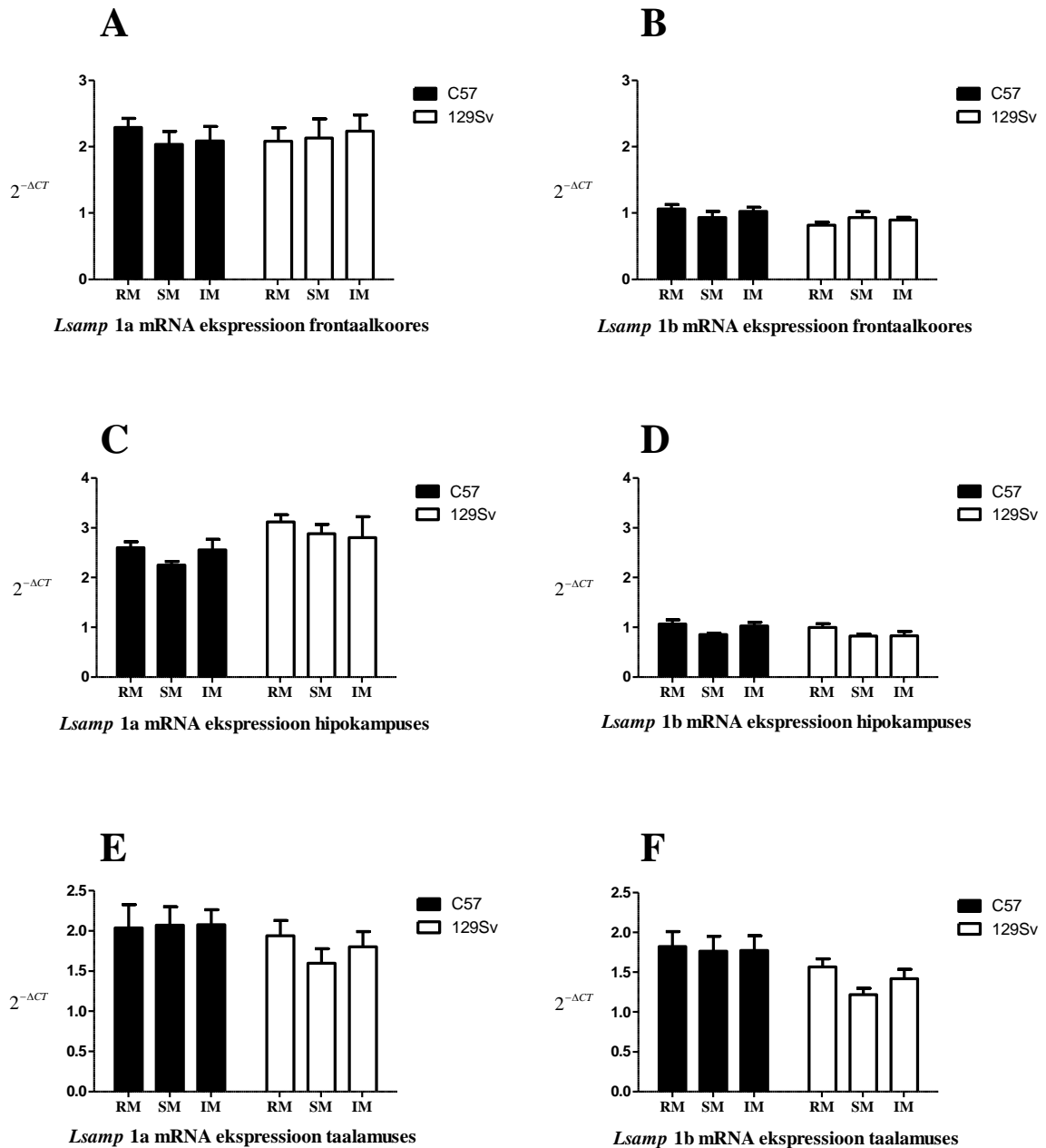
Hipokampuses oli *Lsamp* 1a transkripti ekspressioon suurem rikastatud keskkonnas kui standardtingimustes (joonis 3B; $F(1,28)=4,79$; $p<0,05$), kuid individuaalmajutuses kasvanud hiirte geeniekspressioon ei erinenud statistiliselt standard või rikastatud majutuses kasvanud hiirte 1a ekspressioonist. *Lsamp* 1b promootorala avaldumist mõjutas keskkond ($F(2,42)=3,98$; $p<0,05$). Rikastatud keskkonnas ekspresseerus 1b tugevamini kui tavakeskkonnas (joonis 3B; $F(1, 28)=10,01$, $p<0,01$). Keskkonna mõju *Lsamp* 1a ja 1b ekspressioonile, arvestamata genotüüpi, on näha jooniselt 3B. Hipokampuses ekspresseerus *Lsamp* geeni 1a promootor 129Sv hiireliini puhul rohkem kui C57 hiirtel (joonis 4C; $F(1,42)=6,72$; $p<0,01$). *Lsamp* 1b avaldumist genotüüp ei mõjutanud.



Joonis 3 Kahe liini summeeritud andmed. Bdnf ning Lsamp 1a ja 1b ekspressioon hipokampuses erinevate kasvukeskkondade puhul

Joonisel 4 on näha *Lsamp* geeni 1a ja 1b promootorregioonide ekspressiooni tasemed frontaalkoores, hipokampuses ja taalamuses C57 ja 129Sv võrdluses. Frontaalkoores ei täheldatud *Lsamp* geeni 1a promootorregiooni ekspressioonis ei keskkonna ega genotüübi mõju avaldumisele. 1b promootorala avaldub keskkonnast sõltumata C57 hiirte frontaalkoores rohkem kui 129Sv hiirtes (joonis 4B; $F(1,42) = 4,85$; $p<0,01$).

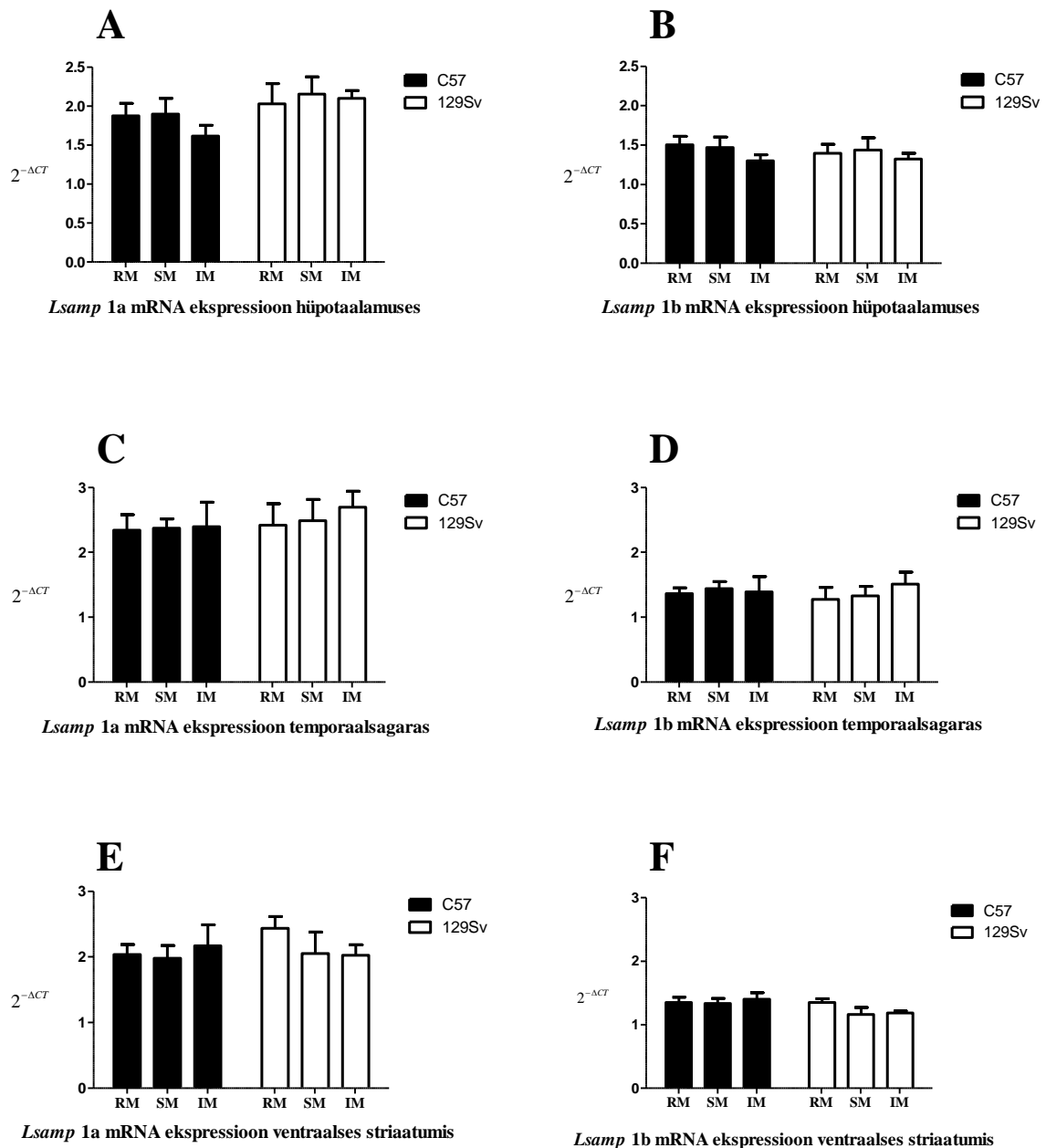
Taalamuses ei esinenud *Lsamp* 1a promootori ekspresseerumisel genotüübi ega ka keskkonnaefekti. *Lsamp* 1b promootor ekspresseerus rohkem C57 hiireliinis kui 129Sv liinis (joonis 4F; $F(1,42)=9,77$; $p<0,01$), kuid kasvukeskkond geeni avaldumist ei mõjutanud.



Joonis 4 *Lsamp* 1a ja 1b mRNA ekspressioon frontaalkoores, hipokampuses ja taalamuses.

Hüpotaalamuses on *Lsamp* 1a promootorala ekspressioonil soodumus genotüüpilisele mõjule, 129Sv hiireliini puhul on avaldumine veidi suurem kui C57 liinis (joonis 5A; $p=0,06$). Keskkond mõju ei anna. *Lsamp* 1b promootori ekspressioonil hüpotaalamuses pole statistiliselt oluline kasvukeskkond ega genotüüp.

Temporaalsagaras ja ventraalses striatumis ei avaldanud genotüüp ega ka kasvukeskkond *Lsmpi* erinevate promootoralade ekspressioonile mõju. Hüpotaalamuses, temporaalsagaras ja ventraalses striatumis esinev *Lsmp* 1a ja 1b promootorjärjestuste ekspressioon on graafiliselt esitatud joonisel 4. Promootorregioon 1a ekspresseerus kõigis kuues ajuosas rohkem kui promootor 1b ($p < 0,001$), mida on näha ka joonistelt 4 ja 5.



Joonis 5 *Lsmp* 1a ja 1b promootoralade ekspressioon hüpotaalamuses, temporaalsagaras ja ventraalses striatumis.

2.4. Arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida interaktsioone kasvukeskkonna ja geeniekspressiooni vahel. Uurisime geeniekspressiooni muutusi kolmes erinevas kasvukeskkonnas (üksikmajutus, standardpuur ja suur rikastatud tingimustega puur) ning määrasime BDNF geeni ekspressiooni kahes ajuosas (frontaalkoor ja hipokampus) ning *Lsmp* 1a ja 1b transkriptide ekspressiooni kuues ajuosas (frontaalkoor, hipokampus, temporaalkoor, ventraalne striatum, hüpotaalamus, taalamus). Võrdlesime geenide avaldumist kahe erineva hiireliini puhul.

Varasemad uuringud on näidanud BDNF valgu ja geeni ekspressiooni tõusu rikastatud keskkonnas (van Praag *et al.* 2000) ning langust isolatsioonis kasvanud hiirte hipokampuses (King *et al.*, 2011). Käesoleva töö tulemused kordavad sama efekti 129Sv hiireliinis, ning tugev tendents on näha C57 hiireliinis. *Bdnf* geeni transkriptsiooni tõus rikastatud keskkonnas kasvanud hiire ajus kinnitab seda, et antud töö katsedisain on toiminud.

Varem on näidatud, et LAMP valg indutseerib sünapside teket (Hashimoto *et al.*, 2009) ning seega on *Lsmp* geen seotud sünaptilise plastilisusega. Samuti on leitud, et *Lsmp*-puudulikkusega hiired ei ole isolatsioonis või rikastatud keskkonna mõjutustele nii tundlikud kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslased (Innos *et al.*, 2012). *Lsmp* geeni seostatakse ärevuse, akuutse ja tingitud hirmuga (Innos *et al.*, 2011), mis võib potentsiaalselt sõltuda ka keskkonnamõjudest. *Lsmp* geeni promootorite ekspresseerumise seost kasvukeskkonnaga pole aga varem uuritud.

Meid huvitas, kas neuronaalse adhesioonimolekuli *Lsmp* ekspressiooni aktiivsus muutub, kui hiired kasvavad üles kolmes väga erinevas keskkonnas – rikastatud, standard- ja individuaalmajutuses. Leidsime, et keskkond avaldas *Lsmp* geeni mõlema promootori ekspressioonile mõju hipokampuses, kuid mitte teistes ajuosades. Nii 1a kui 1b promootor avaldus rohkem rikastatud keskkonnas kasvanud hiire hipokampuses kui standardtingimustes kasvanud hiire hipokampuses, kuid see efekt oli statistiliselt oluline vaid siis, kui summeerisime kahe liini andmed. Hipokampuse tähtsus ajus seisneb hammaskäärus toimivas neurogeneesis, mille käigus tekivad uued närvirakud. Neurogenees on vajalik ruumilise ja esemete tuvastamise mälu toimimiseks (King *et al.* 2011). Qiu *et al.* (2010) on näidanud, et *Lsmp*-puudulikkusega hiirtel on häiritud ka ruumilise mäluga seotud õppimisvõime, mis viitab LAMP valgu olulisusele mäluga seotud närviringete kujunemisel. Kuna rikastatud

keskkonnas suureneb neurogenees ja pakseneb hipokampus (van Praag *et al.*, 2000), siis suureneb ka selle regiooni jaoks tähtsate geenide nagu *Bdnf* ja *Lsmp* ekspressioon.

Samuti leidsime, et *Lsmp* geeni erinevate promootorite ekspressiooni mitmes ajuosas mõjutab genotüüp ehk geneetilise tausta eripära. Erinevate taustaliinide kasutamine on vajalik seetõttu, et on hulgaliselt tõendusmaterjale, et üksikute geenide ekspressiooniaktiivsus sõltub geneetilisest taustast. Näiteks Spencer *et al.* (2011) ristasis emaseid hiiri, kellel oli mutatsioon, mis tekitab autismilaadset käitumist, isaste hiirtega viiest erinevast metsiktüüpi hiireliinist. Katsed näitasid, et haigusele iseloomulikud sümptomid avaldusid üksnes osades taustaliinides, see tähendab ainult teatud geneetilise konteksti puhul. Seega tõestati, et antud geenil on autismi tekkega seos, kuid haiguse väljakujunemiseks on vajalik ka teiste geenide koosmõju (Spencer *et al.*, 2011). Yang *et al.* (2011) ristasis autismilaadsete sümptomitega hiiri kõrge sotsiaalsusega hiirtega. Järglastel polnud sotsiaalseid puuduseid, kuid esines sümptomeid nagu näiteks korduv sugemine. Antud töös kasutasime alternatiivsete taustaliinidena 129Sv ja C57, mis on kaks enimkasutatavat sissearetatud hiireliini transgeneetikas. Nende geneetilisi ja käitumislikke erinevusi on palju uuritud ning käitumiskatsetest on teada, et 129Sv on ärevam kui C57. 129Sv liinil (eriti just 129/SvEvTac ja mitte 129/SvJ) on olnud paremad tulemused veelabürintides, mis näitab tema head õppimisvõimet. C57 liin on aktiivsem ja parema ruumilise koordineerimisega (Võikar *et al.*, 2001).

Ka meie katsetulemused näitasid, et erinevate hiireliinide ajuosades on üksikute transkriptide ekspressioon erinev. Leidsime, et hipokampuses on *Lsmp* 1a ekspressioon kõrgem 129Sv hiireliinis. Kuna *Lsmp* puudulikkusega hiired on vähem ärevad ning kõrgem *Lsmp* tase on väga mitmetes varasemates uuringutes seostunud kõrgema ärevusega, siis võib oletada, et just *Lsmp* 1a transkripti kõrgem ekspressioon võib olla seotud 129Sv hiireliini ärevama fenotüübiga.

Samas oli *Lsmp* 1b ekspressiooni tase frontaalkoores ja taalamuses kõrgem C57 hiireliinis. Seda efekti võib põhjendada sellega, et C57 hiireliin on parema ruumilise koordineerimisega ning *Lsmp* 1b promootor ekspresseerub valdavalt ajuosades, mis töötlevad sensoorset infot (Philips *et al.*, avaldamata andmed). Nii frontaalkoor kui taalamus on väliskeskkonnast tuleva informatsiooni vastuvõtmise seisukohast tähtsad (Buchsbau, 2004; Sherman ja Guillery, 2006).

Lsamp 1a promootor ekspresseerub rohkem ajuosades, mida peetakse klassikaliselt limbilise süsteemi osadeks, näiteks hipokampuses (Philips *et al.*, avaldamata andmed). Kuna 1a ja 1b ekspresseeruvad erinevates ajuosades erineval tasemel, siis võib oletada, et neil on ka erinev mõju hiire käitumisele. Kui C57 hiireliini frontaalkoores ja taalamuses ekspresseerub *Lsamp* 1b rohkem, siis see võib tingida tema parema koordineerimise. 129Sv suurem ärevus võib olla aga seotud *Lsamp* 1a suurema ekspressiooniga.

Töös määrasime *Lsamp* 1a ja 1b ekspressiooni taseme peale mainitud ajuosade ka hüpotaalamuses, temporaalsagaras ja ventraalses striatumis. Neis kolmes regioonis ei avaldanud hiire genotüüp ega erinevas keskkonnas üleskasvamine geeniekspressioonile mõju. BDNF ekspressioonil pole varem liinidevahelisi erinevusi näidatud, kuid meie katsetes esines nii frontaalkoores kui hipokampuses erinevatel genotüüpidel erinev ekspressioon. See informatsioon on oluline uute katsete planeerimisel.

Käesoleva bakalaureusetöö tulemused viitavad, et *Lsamp* geeni ekspressiooni aktiivsuse tõus rikastatud keskkonnas on seotud uute neuronite tekkimise ja sünaptilise plastilisusega. Samuti näitasime, et rikastatud keskkonnast tulenev *Bdnf* geeni ekspressiooni tõusu tase sõltub hiire geneetilisest taustast. Meie uurimus langeb kokku varasemate uuringutega, kus on näidatud, et rikastatud keskkonnast tulenevad neuraalsed muutused toimuvad peamiselt hipokampuses. Töö kinnitab juba varem teada olnud infot ja pakub ka uusi tõendeid rikastatud kasvukeskonna poolt indutseeritud molekulaarsetest muutustest.

2.5. Järeldused

Leidsime, et kasvukeskkond mõjutab geenide ekspressiooni ning see varieerub hiireliinide võrdluses ning erineb suuresti ajuosade vahel. Kõige suuremad muutused toimusid rikastatud keskkonna mõjul hipokampuses.

1. Hipokampuses ekspresseerus *Bdnf* geen rikastatud keskkonnas rohkem kui standard- või individuaalmajutuses kasvanud hiirtel. See tõestab ka katsedisaini toimimist.
2. *Lsamp* 1a mRNA ekspresseerus rikastatud keskkonnas kasvanud hiirte hipokampuses rohkem kui standardtingimustes kasvanud hiirte puhul.
3. *Lsamp* 1b ekspresseerus samuti rikastatud keskkonnas kasvanud hiirte hipokampuses rohkem kui standardtingimustes kasvanud hiirte samas ajuosas.
4. 129S6/SvEv ja C57BL/6 hiireliinide võrdluses tuli välja mitmeid erinevusi.
 - a) *Bdnf* ekspresseerus hipokampuses rohkem 129Sv liinis, frontaalkoores rohkem C57 liinis.
 - b) *Lsamp* 1a ekspresseerus hipokampuses rohkem 129Sv liinis.
 - c) *Lsamp* 1b ekspresseerus nii frontaalkoores kui taalamuses rohkem C57 liinis.

KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöös uurisime, kas limbilise süsteemiga seotud membraanvalgu ekspressiooni aktiivsus erineb rikastatud, standard- või individuaalmajutuses üles kasvanud hiirte ajus. Katsedisaini kontrollimiseks määrasime kahes ajuosas ka BDNF geeni ekspressiooni, kuna antud geen on tuntud marker keskkonnamõjude määramiseks. Varasemalt on näidatud, et *Bdnf* geen avaldub isolatsioonis kasvanud hiirte ajus vähem ning rikastatud keskkonnas kasvanud näriliste ajus rohkem kui tavakeskkonnas (King *et al.*, 2011; van Praag *et al.*, 2000). Kordasime eelnevaid tulemusi katseloomade hipokampuses.

Uurides meid huvitava *Lsamp* geeni avaldumist kuues ajuosas, leidsime, et keskkond mõjutas ekspressiooni vaid hipokampuses ning see efekt oli statistiliselt oluline vaid siis, kui summeerisime kahe liini andmed. Nii *Lsamp* 1a kui 1b promootorregioon avaldus võrreldes tavatingimustega rohkem rikastatud keskkonnas kasvanud hiirte hipokampuses. Hüpotalamuses, taalamuses, frontaalkoores, ventraalses striatumis ja temporaalsagaras keskkonna mõju geeniekspressioonile me ei tuvastanud.

Vaadeldes genotüübi mõju *Bdnf* ja *Lsamp* geenide ekspressioonile, leidsime mitmeid huvitavaid tendentse. Nimelt avaldub *Bdnf* frontaalkoores C57 liinis rohkem kui 129Sv hiireliinis, hipokampuses on efekt aga vastupidine – 129Sv liinis avaldub geen rohkem kui C57 hiirte puhul. *Bdnf* geeni ekspressiooni erinevate genotüüpide puhul pole varem uuritud. *Lsamp* 1a promootorala ekspresseerus hipokampuses 129Sv hiirtes rohkem, kui C57 liinis. *Lsamp* 1b avaldus frontaalkoores ja taalamuses rohkem C57 hiireliinis. Erinevused *Lsamp* 1a ja 1b avaldumises võivad seisneda hiireliinide erinevas füüsilises aktiivsuses, ärevuses, ruumilises mälus või koordinatsioonis.

Käesoleva töö tulemused näitavad, et *Lsamp* geeni ekspressiooni aktiivsus võib olla seotud neuraalsete muutuste ja sünaptilise plastilisusega rikastatud keskkonnas. Samuti näitasime, et rikastatud keskkonnast tulenev *Bdnf* geeni ekspressiooni tõusu tase sõltub hiire geneetilisest taustast. Uurimus tõestab, et rikastatud keskkonnast tulenevad neuraalsed muutused toimuvad peamiselt hipokampuses. Kokkuvõtvalt võib öelda, et töö kinnitab eelnevaid leide ja pakub ka uut informatsiooni rikastatud kasvukeskkonna poolt indutseeritud molekulaarsetest muutustest.

Tänuavaldused

Soovin tänada Mari-Anne Philipsit ja Kersti Lillevälja minu juhendamise eest.

Samuti tänan doktorante Indrek Heinlat, kes õpetas mind Statistica programmi kasutama ja tutvustas mulle ka jooniste tegemise programmi GraphPad, ning Karina Kongi, kellega koos viisin läbi reaalaraja PCR reaktsiooni ja selle tulemuste analüüsi.

Suur aitäh Jürgen Innosele keelelise toimetamise eest.

The influence of rearing conditions on the activity of alternative promoters of *Lsamp* gene in the 129S6/SvEv and C57BL/6 mice lines

Airi Pennert

Summary

This study aimed to see how the environmental manipulations influence gene expression of *Lsamp* (limbic system associated membrane protein) 1a and 1b promotor regions. Two different inbred mouse lines lived in either enriched, standard or individual housing. The expression of *Bdnf* (brain-derived neurotrophic factor) gene was determined as a well-known marker known to be increased in the brains of animals raised in enriched environment.

Environmental and social conditions are often as important as the genetic background in the development of behavior and certain diseases (Slavich and Cole, 2013). The environment can induce or repress the formation of characteristics that are coded by specific genes. To understand the mechanisms that influence homeostasis in the brain during its development and find potential factors that may cause neurological illnesses, model organisms are exposed to several stress-conditions such as isolation which causes permanent changes in the brain and behaviour throughout adulthood (Gresack *et al.*, 2010). Rodents reared in isolation (in comparisson to those reared in standard conditions) are more emotional, anxious, hyperactive in novel envionments and have deficiencies in cognitive qualities (Fone and Porkess, 2008). However, rodents living in enrichment are physically more active, they have better memory and perform better in different learning tasks like watermazes and T-labyrinths. Also, it has been found that enrichment has a therapeutic effect to such conditions as brain trauma, epilepsy, aging and brain stroke (van Praag *et al.*, 2000).

Bdnf is a gene that has been found to be down-regulated in isolated mice and up-regulated in the brains of enriched mice, therefore it is used as a proof for correct research design. Indeed, the results in this paper correlate with the previous findings.

Lsamp gene has been supposed to be concerned with synaptic formation and plasticity (Hashimoto *et al.*, 2009) and synaptic plasticity has been considered to be one of the main mechanisms responsible for the neuronal changes that occur in response to complex stimulation by an enriched environment (van Praag *et al.*, 2000). *Lsamp* gene expression, however, has never been studied in different environments. The protein itself is associated with anxiety disorders, acute and conditional fear, bipolar disorder, schizophrenia and male completed suicide (Innos *et al.*, 2012; Koido *et al.*, 2012; Must *et al.*, 2008). *Lsamp*-deficient

mice weigh less, swim slower, are less anxious, less dominant and more hyperactive in novel environments than their wild-type littermates (Innos *et al.*, 2011, 2012). Philips *et al.* have shown how the two promoters 1a and 1b have different activity in different anatomical areas of the brain. 1a is more expressed in „classic“ limbic system areas like hippocampus, amygdala, temporal cortex, insular cortex etc. 1b is expressed in areas processing the input of sensory information.

As a result of the experiments conducted in this study, it was found that both *Lsamp* 1a and 1b gene expression is influenced by environment in the hippocampus – both promoters were up-regulated in enriched environments compared to standard conditions. However, this effect did not appear to be significant when the two inbred mouse lines were analysed separately. No statistically relevant differences in gene expression were found in the frontal cortex, hypothalamus, thalamus, ventral striatum and temporal cortex of mice that were reared in different conditions. The results of this study are in line with previous study results showing that enrichment increases neurogenesis specifically in the hippocampal area (Brown *et al.*, 2003).

In this study, two mice lines, 129S6/SvEv and C57BL/6, were compared and several expression differences were found between the genotypes. Interestingly, in the hippocampus *Bdnf* was more expressed in the 129Sv mouse line and in the frontal cortex it was expressed more in C57. Such differences in *Bdnf* expression between genotypes have not been shown before. In the hippocampus of 129Sv mice *Lsamp* 1a had significantly higher expressional activity compared with C57 mice. In the frontal cortex and thalamus *Lsamp* 1b was expressed more in C57 than in 129Sv. The reasons for such differences lay most likely in the different physical activity, anxiety levels and spatial memory and coordination of the mouse lines.

In conclusion, this study indicates that the activity of *Lsamp* gene and protein could be involved in the neuronal changes and synaptic plasticity occurring in the enriched environment. The study also shows that the extent of the enrichment-induced up-regulation of *Bdnf* gene in the hippocampal area of mice is dependent on the background strain. The study confirms that the neuronal changes related to the stimulatory effect of enrichment are specific to hippocampal area. Taken together, we were able to confirm findings from the previous studies.

KIRJANDUSE LOETELU

A) Ajakiri

Abazyan, B., Nomura, J., Kannan, G., Ishizuka, K., Tamashiro, K.L., Nucifora, F., Pogorelov, V., Ladenheim, B., Yang, C., Krasnova, I.N., Cadet, J.L., Pardo, C., Mori, S., Kamiya, A., Vogel, M.W., Sawa, A., Ross, C.A., Pletnikov, M.V. (2010) Prenatal interaction of mutant DISC1 and immune activation produces adult psychopathology. *Biol. Psychiatry* 68(12):1172-81.

Baker, M. (2011). Inside the minds of mice and men. *Nature*. 475: 123-128.

Bechara, R. G., Kelly, A. M. (2013). Exercise improves object recognition memory and induces BDNF expression and cell proliferation in cognitively enriched rats. *Behav. Brain Res.* 245: 96–100.

Behan, A. T., Byrne, C., Dunn, M. J., Cagney, G., Cotter, D.R. (2009). Proteomic analysis of membrane microdomain-associated proteins in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder reveals alterations in LAMP, STXBP1 and BASP1 protein expression. *Mol. Psychiatry*. 14: 601–613.

Bergmann, O., Frisen, J. (2013). Why adults need new brain cells. *Science*. 340: 695-696.

Binder, D. K., Scharfman, H. E. (2004). Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors* 22(3): 123-131.

Brown, J., Cooper-Kuhn, C. M., Kempermann, G., Van Praag, H., Winkler, J., Gage, F.H., Kuhn, H.G. (2003). Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 17(10): 2042-6.

Brümmendorf, T., Spaltmann, F., Treubert, U. (1997). Cloning and characterization of a neural cell recognition molecule on axons of the retinotectal system and spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 9(6):1105-16.

Buchsbaum, M. S. (2004). Frontal Cortex Function. *Am. J. Psychiatry*. 161:2178-2178

Dias, B. G., Banerjee, S. B., Duman, R. S., Vaidya, V. A. (2003). Differential regulation of Brain derived Neurotrophic Factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain. *Neuropharmacology* 45: 553–563.

Einon, D. F., Morgan, M. J. (1977) A critical period for social isolation in the rat. *Dev. Psychobiol.* 10: 123–132

Fone, K. C. F., Porkess, M. V. (2008) Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents—Relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neu. Bio. Rev.* 32: 1087–1102.

Freund, J., Brandmaier, A. M., Lewejohann, L., Kriste, I., Kritzler, M., Krüger, A., Sachser, N., Lindenberger, U., Kempermann, G. (2013) Emergence of individuality in genetically identical mice. *Science*. 340: 756–759.

Gresack, J., Powell, S., Geyer, M., Poore, M.-S., Coste, S., Risbrough, V. (2010). CRF2 null mutation increases sensitivity to isolation rearing effects on locomotor activity in mice. *Neuropeptides*. 44(4): 349–353.

Hashimoto, T., Maekawa, S., Miyata, S. (2009). IgLON cell adhesion molecules regulate synaptogenesis in hippocampal neurons. *Cell Biochem. Funct.* 27: 496–498.

Heimer, L., Van Hoesen, G. W. (2006). The limbic lobe and its output channels: Implications for emotional functions and adaptive behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 30: 126–147.

Holson, R. R., Scallet, A. C., Ali, S. F., Turner, B. B. (1991). Isolation stress revisited— isolation-rearing effects depend on animal care methods. *Physiol. Behav.* 49: 1107–1118.

Innos J, Philips M.A., Leidmaa, E., Heinla, I., Raud, S., Reemann, P. (2011). Lower anxiety and a decrease in agonistic behaviour in Lsamp-deficient mice. *Behav. Brain. Res.* 217: 21–31.

Innos, J., Philips, M.-A., Raud, S., Lilleväli, K., Kõks, S., Vasar, E. (2012). Deletion of the Lsamp gene lowers sensitivity to stressful environmental manipulations in mice. *Behav. Brain Res.* 228:74–81.

Kempermann, G., Kuhn, G. H., Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 386: 493- 495.

Koido, K., Traks, T., Balõšev, R., Eller, T., Must, A., Koks, S., Maron, E., Tõru, I., Shlik, J., Vasar, V., Vasar, E. (2012): Associations between LSAMP gene polymorphisms and major depressive disorder and panic disorder. *Transl Psychiatry*. 2: 152.

Maren, S. (2001). Neurobiology of pavlovian fear conditioning. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 897–931

Marsden, C. A., King, M. V., Fone, K. C. F. (2011). Influence of social isolation in the rat on serotonergic function and memory - relevance to models of schizophrenia and the role of 5-HT₆ receptors. *Neuropharmacology* 61: 400-407.

Metsis, M., Timmusk, T., Arenas, E., Persson, H. (1993) Differential usage of multiple brain-derived neurotrophic factor promoters in the rat brain following neuronal activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 8802–8806.

Murray, P. S., Holmes, P. V. (2011). An Overview of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Implications for Excitotoxic Vulnerability in the Hippocampus. *Int J Pept.* 2011:1-12

Must, A., Tasa G., Lang, A., Vasar, E., Kõks, S., Maron, E. and Väli, M. (2008). Association of limbic system-associated membrane protein (LSAMP) to male completed suicide. *BMC Med. Genet.* 9:34

Oliver, P.L., Davies, K.E. (2012). New insights into behaviour using mouse ENU mutagenesis. *Hum. Mol. Genet.* 21(R1):R72-81.

Pang, T. Y. C., Hannan, A. J. (2013). Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity. *Neuropharmacology*. 64: 515-528.

Philips et al (2013) Lsamp is implicated in the regulation of emotional and social behavior by use of alternative promoters in the brain (esitatud avaldamiseks mai).

Pimenta, A. F., Zhukareva, V., Barbe, M. F., Reinoso, B. S., Grlmley, C., Henzel, W., Fischer, I., Levitt, P. (1995). The limbic system-associated membrane protein is an Ig superfamily member that mediates selective neuronal growth and axon targeting. *Neuron*. 15: 287-297.

Pimenta, A.F., Levitt, P. (2004). Characterization of the genomic structure of the mouse limbic system-associated membrane protein (Lsamp) gene. *Genomics*. 83:790-801.

Qiu, S., Champagne, D.L., Peters, M., Catania, E.H., Weeber, E.J., Levitt, P., Pimenta, A.F. (2010). Loss of limbic system-associated membrane protein leads to reduced hippocampal mineralocorticoid receptor expression, impaired synaptic plasticity, and spatial memory deficit. *Biol. Psychiatry*. 68(2):197-204.

Reed, J., McNamee, C., Rackstraw, S., Jenkins, J., Moss, D. (2004). Diglons are heterodimeric proteins composed of IgLON subunits, and Diglon-CO inhibits neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *J. Cell Sci*. 117: 3961-3973.

Rios, M., Fan, G., Fekete, C., Kelly, J., Bates, B., Kuehn, R., Lechan, R.M., Jaenisch, R. (2001). Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol*. 15:1748–1757.

Slavich, G. M., Cole, S. W. (2013). The Emerging Field of Human Social Genomics. *Clinical Psychological Science*. XX(X) 1–18. (artikkel pole veel ilmunud).

Spencer, C.M., Alekseyenko, O., Hamilton, S.M., Thomas, A.M., Serysheva, E., Yuva-Paylor, L.A., Paylor, R. (2011) Modifying behavioral phenotypes in *Fmr1*KO mice: genetic background differences reveal autistic-like responses. *Autism Res*. 4, 40–56.

Van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci*. 1(3): 191-198.

Võikar, V., Kõks, S., Vasar, E., Rauvala, H. (2001). Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol. Behav*. 72(1–2): 271–281.

Washbourne, P. , Dityatev, A., Scheiffele, P., Biederer, T., Weiner, J.A., Christopherson, K. S., El-Husseini, A. (2004). Cell Adhesion Molecules in Synapse Formation. J. Neurosci. 24(42):9244 –9249.

Yang, M., Perry, K., Weber, M.D., Katz, A.M., Crawley, J.N. (2011) Social peers rescue autism-relevant sociability deficits in adolescent mice. Autism Res. 4(1):17-27.

B) Raamat

Kärner, J. (1997). Sissejuhatus arengubioloogiasse. p. 136. Tartu Ülikooli kirjastuse trükikoda. Tartu.

Sherman, S. M., Guillery, R. W. (2006). Exploring the Thalamus and Its Role in Cortical Function. p. 1. MIT Press. London.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Airi Pennert (sünnikuupäev: 23. märts 2013)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Kasvukeskkonna mõju Lsamp geeni alternatiivsete promootorite aktiivsusele 129S6/SvEv ja C57BL/6 hiireliinides“, mille juhendajad on Mari-Anne Philips ja Kersti Lilleväli
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28. mail 2013